

# ANALIZA FRAKTALNA KSZTAŁTU KOMÓREK\*

## FRACTAL ANALYSIS OF CELLS SHAPE

Dariusz ORŁOWSKI, Zbigniew SOŁTYS

Zakład Neuroanatomii, Instytut Zoologii UJ, Kraków

**Streszczenie:** Kształt komórek tkanki nerwowej jest często bardzo skomplikowany, stąd wynika konieczność stosowania zaawansowanych metod matematycznych do jego opisu. Jedną z tych metod wywodzi się z geometrii fraktalnej. Prezentowany artykuł przedstawia podstawowe metody obliczania wymiaru fraktalnego komórek oraz przykłady jego zastosowania. Opisane zostały cztery metody obliczania wymiaru fraktalnego: metoda dylatacji, pudełkowa, cyrkla i pudełek z piaskiem. Mogą one zostać użyte w analizie złożoności przestrzennej komórek innych tkanek, a także naczyń krwionośnych, nowotworów i wielu innych struktur biologicznych. Uzupełnieniem wymiaru fraktalnego mogą być parametry, takie jak: rozmiar, masywność czy kołowość, które opisują odmienne cechy badanych obiektów. Łączne zastosowanie tych parametrów pozwala dokładniej opisać morfologię komórek.

**Słowa kluczowe:** analiza fraktalna, morfologia, glej, neurony.

**Summary:** Shape of the nervous tissue cells is often very complicated and to describe it we have to apply advanced methods of mathematical analysis. One of these methods derives from fractal geometry. This paper presents selected basic methods of calculation of the cell fractal dimension and examples of their application. Fractal dimension can be measured by pixel dilation, box counting, calliper and mass-radius methods. The methods can be used to measure the space-filling properties of various cell types, blood vessels, tumours etc. Additional parameters of the cell such as its solidity, convex hull area and form factor describe different shape features and are of important values complementary to fractal dimension. Simultaneous application of the parameters together with fractal dimension present characteristics of the cell morphology more complete.

**Key words:** fractal analysis, morphology, glia, neurones.

## 1. WSTĘP

Niewiele komórek ma równie skomplikowany kształt, jak te, które znajdujemy w tkance nerwowej. Ich morfologia wiąże się z pełnią przez nie funkcją. Stąd też istnieje konieczność znalezienia sposobu jej precyzyjnego opisu. Ilościowa analiza takiej struktury nie jest łatwa, zwłaszcza że w praktyce musimy zazwyczaj pracować z jej dwuwymiarowym obrazem mikroskopowym. Podstawowe parametry opisujące dwuwymiarowy obraz komórki, takie jak powierzchnia czy obwód, są często niewystarczające do opisu przestrzennej struktury tych komórek. Rozwiązaniem może być zastosowanie analizy fraktalnej umożliwiającej ilościowy opis morfologii nawet bardzo skomplikowanych obiektów [8, 14, 17, 19, 41]. W jej wyniku otrzymujemy współczynnik będący miarą komplikacji kształtu – wymiar fraktalny, zazwyczaj oznaczany przez  $D$  [37, 38].

Celem przedstawionego przeglądu jest omówienie metod analizy fraktalnej w badaniach morfologii komórek oraz jej najważniejszych osiągnięć. Nie wyczerpuje to oczywiście wszystkich możliwych zastosowań tej metody. W ostatnich latach analiza fraktalna oraz inne ilościowe metody morfologiczne zyskują wciąż wzrastającą popularność i wykorzystuje się je w wielu dziedzinach nauki. Oprócz wspomnianego wcześniej opisu pojedynczych komórek, badania te obejmować mogą również ich grupy, takie jak kolonie bakterii czy grzybów [29, 46]. Poza analizą kształtów możliwy jest również pomiar wymiaru fraktalnego powierzchni. Bada się w ten sposób tkanki lub kolonie komórek [3, 9, 36]. Parametr  $D$  powierzchni może mieć również znaczenie w diagnostyce tkanek zmienionych w wyniku kancerogenezy [15, 26, 30]. W przypadku zdjęć rentgenowskich lub obrazów uzyskanych przy pomocy MRI (obrazowanie za pomocą rezonansu magnetycznego) analiza fraktalna umożliwia wychwycenie subtelnych zmian w przebiegu osteoporozy [11]. Obrazy pochodzące z mikroskopu elektronowego mogą posłużyć do zbadania zmian wymiaru fraktalnego struktur komórkowych, co wykorzystano między innymi w analizie zmian kształtu jądra komórkowego i heterochromatyny w komórkach nowotworowych, oraz wpływu na nie hormonów sterydowych [28, 34]. Metody fraktalne wykorzystać można również w analizie procesów genetycznych i efektów leczenia nowotworów [49, 50, 51].

Wymiar fraktalny struktur pozakomórkowych, takich jak płytki starcze w mózgu, może mieć istotne znaczenie w diagnozowaniu choroby Alzheimera [33].

Za pomocą analizy fraktalnej Waliszewski wraz z współpracownikami badali zależności pomiędzy genotypem a fenotypem analizując tworzenie się i samoorganizację sieci komórkowych [49, 50, 51, 52]. Obrazy MRI posłużyć mogą do badania przepływu krwi w różnych narządach [22, 24, 47] oraz wiązania znakowanych substancji (na przykład neuroprzekazników) do receptorów [25]. Analizować można również sygnały elektryczne powstające na synapsach oraz kinetykę kanałów jonowych [27, 45].

Omawiane metody znalazły także zastosowanie w analizie ruchów organizmów, czego przykład stanowią badania stabilności postury człowieka przez opis zmian położenia punktu nacisku ciała na podłoże [5, 10].

## 2. FRAKTALE

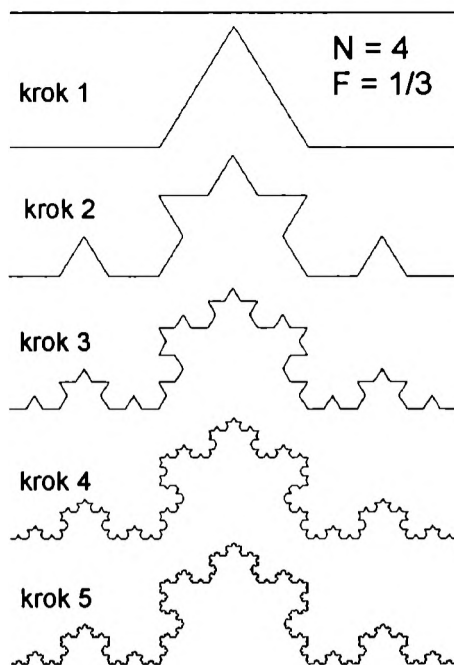
Typowe figury i bryły geometryczne, takie jak linia, kwadrat czy sześcian, można dokładnie opisać za pomocą geometrii euklidesowej, przedstawiając je odpowiednio w jednym, dwóch lub trzech wymiarach. Obiekty występujące w przyrodzie umykają jednak takiemu opisowi. Benoit Mandelbrot zauważył, że istnieją kształty możliwe do opisania jedynie za pomocą wymiaru ułamkowego (fraktalnego). Przykładem idealnego fraktala jest krzywa (zbiór) Kocha. Rycina 1 przedstawia kolejne etapy jej tworzenia. Widać, że składa się ona z coraz większej liczby powtórzonych krzywych z pierwszego kroku. Krzywą Kocha otrzymujemy po nieskończonej ilości powtórzeń. Jedną z jej cech jest samopodobieństwo – odpowiednio po-większony fragment podobny jest do całości.

W przyrodzie można spotkać wiele obiektów przypominających abstrakcyjne obiekty fraktalne, na przykład kwiat kalafiora, drzewo oskrzelików płucnych, sieć naczyń krwionośnych, a także komórki układu nerwowego – neurony, astrocyty, mikroglej [ 8, 14, 17, 19, 32, 35, 41, 44]. Fragment kwiatu kalafiora czy sieci naczyń krwionośnych odpowiednio powiększony jest podobny do całości. Zaznaczyć należy, iż struktury te są fraktalami wyłącznie w sensie statystycznym. Od idealnych fraktali matematycznych różnią się tym, że cechy fraktalne wykazują tylko w pewnych przedziałach skali; ograniczenie to wynika z natury obiektów – nie są one tworzone w wyniku nieskończonej ilości iteracji i odpowiednio powiększone fragmenty przestają być podobne do całości. Niemniej jednak analiza fraktalna pozwala w sposób ilościowy opisać stopień komplikacji takich struktur.

Samopodobieństwo figur geometrycznych, takich jak krzywa Kocha, opisać można za pomocą równania wykładniczego [16, 21, 49, 53]:

$$N = F^D \quad (1)$$

gdzie  $N$  jest liczbą pomniejszonych  $F$  razy kopii, z których składa się fraktal w kolejnym kroku jego konstruowania (ryc. 1).



RYCINA 1 Schemat konstrukcji krzywej Kocha

Korzystając z równania (1), wymiar fraktalny  $D$  definiuje się następująco [4, 8, 16, 20]:

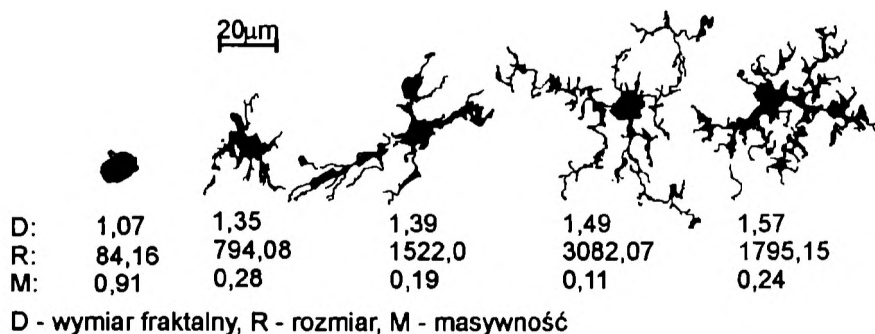
$$D = \log(N)/\log(F) \quad (2)$$

Dla figur na płaszczyźnie zawiera się on pomiędzy 1 a 2.

Przykładowo, wymiar fraktalny zbioru Kocha można policzyć korzystając ze wzoru (2)[13, 16]:

$$D = \log(4)/\log(3) = 1,26$$

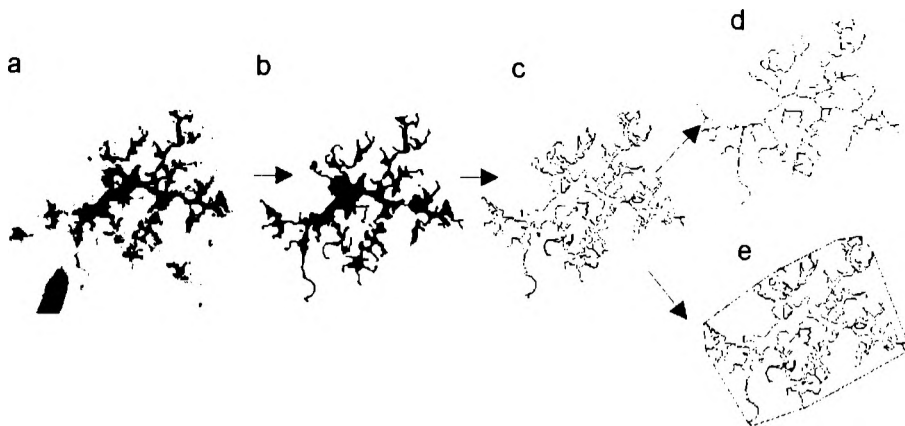
Przedstawioną metodą można obliczyć wymiar fraktalny dobrze zdefiniowanych figur geometrycznych o znanych parametrach  $N$  i  $F$ , takich jak zbiór Kocha. Wymiar  $D$  obiektów naturalnych można uzyskać tylko w sposób przybliżony, stosując metody przedstawione poniżej. Stanowią one jednak dobre przybliżenie komplikacji przestrzennej komórki – im bardziej rozbudowana struktura wypustek, tym wyższa wartość  $D$  [1, 13, 35] (ryc. 2).



RYCINA 2. Sylwetki komórek mikrogleju wraz z podstawowymi parametrami opisującymi ich morfologię (wymiar fraktalny oraz masywność – jednostki bezwymiarowe; rozmiar [ $\mu\text{m}$ ])

### 3. METODY OBLICZANIA WYMIARU FRAKTALNEGO

Pierwszym etapem w analizie fraktalnej jest uzyskanie obrazu przedstawiającego sylwetkę komórki. Niekiedy proces ten może być wykonany automatycznie przez odpowiedni program do analizy obrazu [55]. Funkcja wykonująca tę czynność nosi nazwę binaryzacji (*thresholding*) (ryc. 3b). W innych przypadkach zachodzi konieczność ręcznego obrysowania sylwetek komórek. Jest to etap, którego dokładność może zaważyć na późniejszych wynikach. Powodzenie procedur automatycznych uzależnione jest od charakterystyki badanego obiektu, który powinien wyraźnie wyróżniać się z tła, co wiąże się między innymi z zastosowanymi technikami obróbki histologicznej.



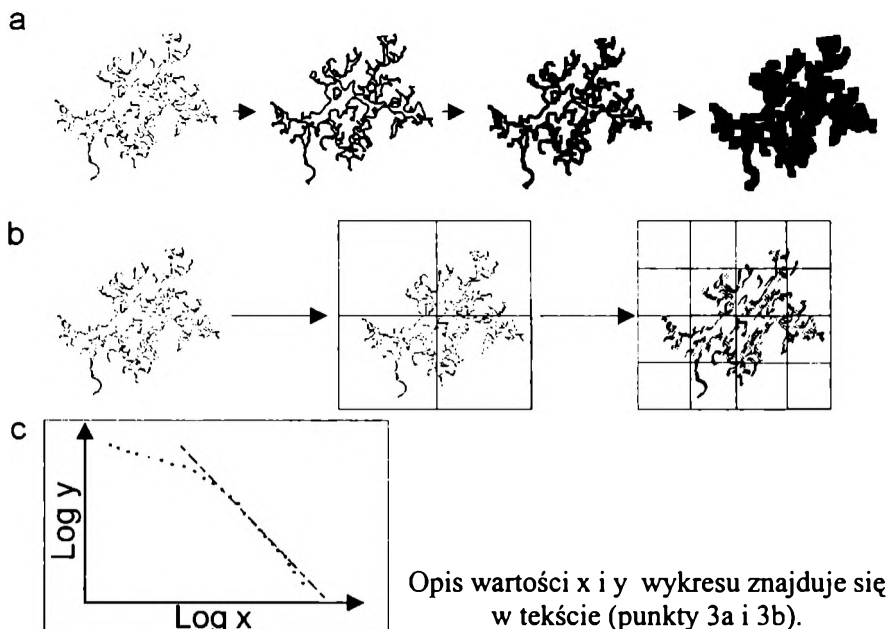
RYCINA 3. Początkowe etapy analizy obrazu: a – obraz mikroskopowy komórki mikrogleju, b – obraz binarny, c – obrys komórki, d – szkielet, e – obrys komórki wraz z wypukłym wielokątem opisanym na jej wypustkach

Po otrzymaniu obrazu binarnego badanej struktury, a przed jej analizą fraktalną, można dodatkowo przekształcić obraz tak, by otrzymać jej obrys (ryc. 3c) lub szkielet (ryc. 3d). W analizie fraktalnej komórki najpowszechniej wykorzystuje się obrysy, ponieważ odwzorowują one jej kształt, natomiast szkielet jest w znaczącym stopniu artefaktem, gdyż nie zawiera jej centralnych obszarów [19] i może dać zafałszowany wynik  $D$ . Obraz w postaci szkieletu wykorzystuje się w badaniach sieci naczyń krwionośnych lub charakterystyki rozgałęzień komórek [16].

a) Jedną z najczęściej używanych metod wyznaczania wymiaru fraktalnego jest metoda dylatacji, która z powodzeniem była stosowana przez wielu badaczy [6, 13, 17, 30, 41, 43, 44]. Jest to technika łatwa do automatycznego przeprowadzenia – opierająca się na procedurach dostępnych w standardowych programach do analizy obrazu i dająca dobre wyniki. Polega ona na zastępowaniu każdego punktu obrysu kołami o rosnących średnicach, za każdym razem mierzone jest pole powierzchni powstałej figury (ryc. 4a). Powierzchnia figury podzielona przez średnice kół (ryc. 4c, wartość  $y$ ) wykreślana jest w skali logarytmiczno-logarytmicznej (log-log), względem tej średnicy (ryc. 4c, wartość  $x$ ) [8, 13, 19, 42, 44]. Dla liniowego odcinka otrzymanej krzywej obliczany jest współczynnik nachylenia ( $S$ ), powiązany z wymiarem fraktalnym ( $D$ ) zależnością:

$$D = 1 - S \quad (3)$$

b) Kolejną, często stosowaną metodą, jest metoda pudełkowa (*box counting*). Na powierzchnię badanego obszaru nakładane są kolejno siatki złożone z kwadratów o coraz mniejszej długości boku (ryc. 4b), w każdej siatce zliczana jest liczba kwadratów zawierających część badanej struktury (ryc. 4c, wartość  $y$ ). Tę liczbę przedstawia się na wykresie względem długości boku kwadratu (ryc. 4c wartość



RYCINA 4. Przebieg analizy fraktalnej: a – metoda dylatacji, b – metoda pudełkowa, c – wykres log – log (dla przedstawionej komórki mikrogleju). Dla metody dylatacji wartość y – powierzchnia powstałej figury podzielona przez średnicę elementów strukturalnych, x – średnica elementów strukturalnych; dla metody pudełkowej: y – liczba kwadratów zawierających fragment badanej struktury, x – długość boku kwadratu

x) w skali log-log. Wymiar fraktalny powiązany jest z nachyleniem linii regresji otrzymanej krzywej zależnością (3) [4, 8, 13, 14, 19, 20, 39, 42].

- c) Inną metodą jest metoda „linijki” (*calliper*), w której obwód figury mierzony jest za pomocą coraz krótszej linijki, a wyniki przedstawiane są na wykresie log-log.
- d) Kolejna, to metoda „pudełek z piaskiem” (*mass-radius, sandbox*). Polega ona na tym, że na wybranych losowo punktach obrazu rysowane są okręgi o rosnących średnicach (lub kwadraty o rosnącej długości boku), następnie zliczane są wszystkie zawierające się w nich punkty obrysu [13, 19, 42]. Następnie, podobnie jak w poprzednich metodach określa się na wykresie log-log zależność między tą liczbą a średnicą kół (długością boku kwadratów).

Do testowania poszczególnych metod często używa się obiektów matematycznych o znanych D. Stąd wiadomo, że metoda dylatacji oraz pudełkowa nieco zaniżają wymiar fraktalny, a metoda „pudełek z piaskiem” daje trochę zawyżone wartości D [41].

## 4. PROBLEMY ANALIZY FRAKTALNEJ

Podstawowym problemem opisanych technik jest znalezienie jak najlepszego dopasowania krzywej regresji. Jak wspomniano wcześniej, opis fraktalny naturalnych obiektów możliwy jest tylko w pewnych granicach skali. Wynika z tego brak zależności liniowej na wykresie log-log. Niektórzy autorzy [13] dopasowywali linię regresji do całej otrzymanej krzywej, jednakże błąd dopasowania jest w tym przypadku bardzo duży. W części prac postuluje się wykonywanie obliczeń tylko dla jej liniowego odcinka. Poszukuje się takiego zakresu danych, który dla największej liczby punktów branych pod uwagę daje najmniejszy błąd dopasowania [13].

Kolejne błędy mogą wynikać z zastosowanych procedur obróbki obrazu. Jakość sprzętu mikroskopowego, rozdzielczość obrazu wykorzystanego w analizie oraz zastosowany program komputerowy może wpłynąć na otrzymane wyniki. Odmienne metody obliczania wymiaru fraktalnego również prowadzą do otrzymania różniących się wartości  $D$ . Wymusza to ostrożność w porównywaniu bezwzględnych wartości wymiaru fraktalnego otrzymanych w różnych eksperymentach. Ponadto analiza fraktalna jest niewrażliwa na pewne cechy morfologiczne (takie jak grubość i długość wypustek), stąd też wskazane jest obliczanie parametru  $D$  w połączeniu z innymi pomiarami stereologicznymi [41, 42].

## 5. ANALIZA FRAKTALNA KOMÓREK TKANKI NERWOWEJ

Podstawowym zastosowaniem analizy fraktalnej w naukach biologicznych są badania kształtu komórek o skomplikowanej morfologii, posiadających wypustki, takich jak neurony czy komórki glejowe. Wymiar fraktalny pozwala opisać zmiany zachodzące zarówno w czasie normalnego rozwoju [1, 2, 3, 7, 32, 35, 40, 42, 48], jak i w stanach patologicznych [43, 44]. Przykładem są badania komórek mikrogleju, które w trakcie rozwoju zmieniają swój kształt od form amebowatych do silnie rozgałęzionych [35]. W stanach patologicznych obserwujemy proces odwrotny – zmianę kształtu w kierunku form fagocytujących [44]. Analiza fraktalna pozwala na uchwycenie zmian niedostępnych drogą subiektywnej klasyfikacji i opisanie ich w sposób ilościowy, ułatwiający późniejszą analizę wyników. Dzięki niej zauważono wzrost komplikacji kształtu mikrogleju, klasyfikowanych wcześniej do formy spoczynkowej [35] oraz subtelne różnice złożoności morfologicznej komórek między mózgiem zdrowym a uszkodzonym [44].

Analizę fraktalną wykorzystano w badaniach wpływu obecności astrocytów na rozwój neuronów [40] oraz oligodendrocytów [32] w kulturach komórkowych, a także rozwoju astrocytów oraz oligodendrocytów z ich wspólnej komórki prekursorowej (O2A) [1]. W tych przypadkach również stwierdzono występowanie subtelnych różnic złożoności kształtu komórek hodowanych w różnych środowiskach, które trudne byłoby

do zauważenia przy zastosowaniu klasycznych metod badań morfologicznych. Możliwy był również dokładny opis przebiegu zmian morfologii w czasie. Parametr D znalazł zastosowanie również w identyfikacji stadiów rozwojowych oligodendrocytów [2]. Wymiar fraktalny pozwala na ilościowy opis złożoności komórek nerwowych [14, 20], co ułatwia badanie zmian, takich jak: tworzenie, rozbudowa i zmiany komplikacji drzewka dendrytycznego podczas rozwoju, a także pod wpływem czynników zewnętrznych [6, 19, 23]. Próbuje się go również wykorzystać w klasyfikacji form tych komórek, większość badań w tym zakresie dotyczy klasyfikacji neuronów siatkówki [12, 18, 31, 54], które różnią się swoją złożonością przestrzenną. Przy użyciu wymiaru D możliwa jest również w pełni automatyczna klasyfikacja form komórkowych [7].

## 6. INNE PARAMETRY OPISUJĄCE KSZTAŁT KOMÓREK

Morfologię komórek można scharakteryzować za pomocą wielu innych parametrów, na których pomiar pozwala komputerowa analiza obrazu. Poza podstawowymi, takimi jak powierzchnia, obwód, długość, ilość wypustek, przydatne w analizie są również: rozmiar (zasięg wypustek), rozumiany jako pole wypukłego wielokąta opartego na wypustkach (*convex hull area*), oraz masywność, czyli stosunek pola komórki do pola tego wielokąta (*solidity*)(ryc.3e). Pierwszy z tych parametrów powiązany jest bezpośrednio z długością wypustek, drugi różnicuje komórki o odmiennej ich grubości.

Kolejnym, dość często stosowanym parametrem jest współczynnik kształtu (*form factor*), równy

$$4\pi \cdot \text{pole powierzchni/obwód}^2$$

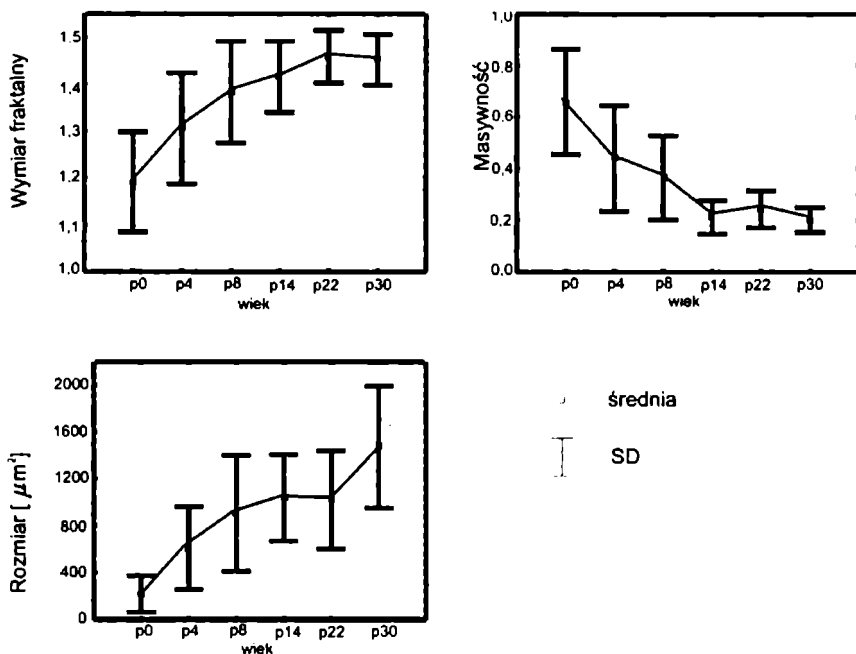
Dla idealnego koła jest on równy 1, a im bardziej nieregularny jest kształt, tym niższe są wartości tego parametru. Nadaje się on raczej do badania figur o kształtach nieznacznie odbiegających od kołistego np. komórek amebowatych [23].

Parametry te opisują różne aspekty geometrii badanego kształtu. Rycina 5 pokazuje przebieg zmian trzech wybranych parametrów opisujących komórki mikrogleju w rozwijającym się mózgu szczura. Jak widać, żaden z nich zastosowany osobno nie daje pełnego obrazu zmian tych komórek [Orłowski 2001, przygotowywane do publikacji]. Wymiar fraktalny rósł do 22. dnia życia, masywność malała do 14. dnia życia, a rozmiar zwiększał się przez cały okres objęty badaniami (ryc. 5).

## 7. PODSUMOWANIE

Analiza fraktalna, mimo swych niedoskonałości, w połączeniu z innymi pomiarami stereologicznymi, stanowi wygodne i obiektywne narzędzie służące do opisu kształtu komórek oraz ich zmian. Stosowanie obiektywnych narzędzi komputerowej analizy





RYCINA 5. Zmiany wymiaru fraktalnego, masywności i rozmiaru komórek mikrogleju w rozwijającym się mózgu szczura

obrazu ułatwia analizę danych oraz ich porównywanie, a ilościowe wyniki pozwalają na zastosowanie różnorodnych metod statystycznych. Biorąc to pod uwagę należy nadal pracować nad udoskonalaniem komputerowo wspomaganą analizę obrazu i jej praktycznych zastosowań w biologii i medycynie.

## LITERATURA

- [1] BEHAR TN. Analysis of fractal dimension of O2A glia cells differentiating *in vitro*. *Methods* 2001; **24**: 331–339.
- [2] BERNARD F, BOSSU J, GAILLARD S. Identification of living oligodendrocyte developmental stages by fractal analysis of cell morphology. *J Neurosci Res* 2001; **65**: 439–445.
- [3] BIGERELLE M, IOST A. A new fractal method to calculate the fractal dimension of surfaces: application to human cell proliferation. *Comput Math Applic* 2001; **42**: 241–253.
- [4] BISOI AK, MISHRA J. On calculation of fractal dimension of images. *Patt Recogn Lett* 2001; **22**: 631–637.
- [5] BŁASZCZYK JW, KLONOWSKI W. Postural stability and fractal dynamics. *Acta Neurobiol Exp* 2001; **61**: 105–112.
- [6] BORODINSKY LN, FISZMAN ML. A single-cell model to study changes in neuronal fractal dimension. *Methods* 2001; **24**: 341–345.
- [7] COSTA LF, VELTE TJ. Automatic characterisation and classification of ganglion cells from the salamander retina. *J Comp Neurol* 1999; **404**: 33–51.
- [8] CROSS SS. Fractals in pathology. *J Pathol* 1997; **182**: 1–8.

- [9] DEPETRILLO PB, YANG Q, RACKOFF J, SANMIGUEL A, KARIMULLAH K. Surface fractal computation and its application to immunofluorescent histochemical studies of calpain and calpastatin in PC12 cells. *J Neurosci Methods* 2000; **103**: 191–197.
- [10] DUARTE M, ZATSORSKY VM. On the fractal properties of natural human standing. *Neurosci Lett* 2000; **283**: 173–176.
- [11] FAULKNER KG, POCOCCO N. Future methods in the assessment of bone mass and structure. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001; **15**: 359–383.
- [12] FERNANDEZ E, ELDRED WD, AMMERMULLER J, BLOCK A, BLOH W, KOLB H. Complexity and scaling properties of amacrine, ganglion, horizontal and bipolar cells in the turtle retina. *J Comp Neurol* 1994; **347**: 397–408.
- [13] FERNANDEZ E, JELINEK HF. Use of fractal theory in neuroscience: methods, advantages, and potential problems. *Methods* 2001; **24**: 309–321.
- [14] FERNANDEZ E, BOLEA JA, ORTEGA G, LOUIS E. Are neurones multifractals? *J Neurosci Methods* 1999; **89**: 151–157.
- [15] HANDELS H, ROB TH, KREUSCH J, WOLFF HH, POPPL SJ. Computer-supported diagnosis of Melanoma in profilometry. *Meth Inform Med* 1999; **38**: 43–49.
- [16] HERMAN P, KOCIS L, EKE A. Fractal branching pattern in the pial vasculature in the cat. *J Cerebral Blood Flow Metabol* 2001; **21**: 741–753.
- [17] HEYMANS O, FISSETTE J, VICO P, BLACHER S, MASSET D, BROUERS F. Is fractal geometry useful in medicine and biomedical sciences? *Med Hypotheses* 2000; **54**: 360–366.
- [18] JELINEK HF, SPENCE I. Categorisation of physiologically and morphologically characterised non-a / non-b cat retinal ganglion cells using fractal geometry. *Fractals* 1997; **5**: 673–684.
- [19] JELINEK HF, FERNANDEZ E. Neurones and fractal: how reliable and useful are calculations of fractal dimensions? *J Neurosci Methods* 1998; **81**: 9–18.
- [20] JESTCZEMSKI F, SERNETZ M. Multifractal approach to inhomogeneous fractals. *Physica A* 1996; **225**: 275–282.
- [21] JONES CL, JELINEK HF. Wavelet packet fractal analysis of neuronal morphology. *Methods* 2001; **24**: 347–358.
- [22] KALLIOKOSKI KK, KUUSELA TA, NUUTILA P, TOLVANEN T, OIKONEN V, TERÄS M, TAKALA TES, KNUUTI J. Perfusion heterogeneity in human skeletal muscle: fractal analysis of PET data. *Eur J Nucl Med* 2001; **28**: 450–456.
- [23] KAWA A, STAHLHUT M, BEREZIN A, BOCK E, BEREZIN V. A simple procedure for morphometric analysis of processes and growth cones of neurones in culture using parameters derived from the contour and convex hull of the object. *J Neurosci Methods* 1998; **79**: 53–64.
- [24] KUIKKA JT, HARTIKAINEN P. Heterogeneity of cerebral blood flow: a fractal approach. *Nuklearmedizin* 2000; **39**: 37–42.
- [25] KUIKKA JT, REPO E, BERGSTROM KA, TUPALA E, TIIHONEN J. Specific binding and laterality of human extrastriatal dopamine D2/D3 receptors in late onset type 1 alcoholic patients. *Neurosci Lett* 2000; **292**: 57–59.
- [26] LANDINI G, RIPPIN JW. How important is tumour shape? Quantification of the epithelial-connective tissue interface in oral lesions using local connected fractal dimension analysis. *J Pathol* 1996; **179**: 210–217.
- [27] LIEBOVITCH LS, SCHEURLE D, RUSEK M, ZOCHOWSKI M. Fractal Methods to Analyse Ion Channel Kinetics. *Methods* 2001; **24**: 359–375.
- [28] LOSA GA, GRABER R, BAUMANN G, NONNENMACHER TF. Effects of steroid hormones on nuclear membrane and membrane-bound heterochromatin from breast cancer cells evaluated by fractal morphometry. *Analit Quantitative Cytol Histol* 1999; **21**: 430–436.
- [29] LUNDY SD, PAYNE RJ, GILES KR, GARRILL A. Heavy metals have different effects on mycelial morphology of *Achlya bisexualis* as determined by fractal geometry. *FEMS Microbiol Lett* 2001; **201**: 259–263.
- [30] MATTENFELDT T. Non-linear deterministic analysis of tissue texture: a stereological study on mastopathic and mammary cancer tissue using chaos theory. *J Microscop* 1997; **185**: 47–66.
- [31] MORIGIWA K, TAUCHI M, FUKUDA Y. Fractal analysis of ganglion cell dendritic branching patterns of the rat and cat retinae. *Neurosci Res Suppl* 1989; **10**: 131–140.
- [32] MORLEY M, PLEASURE D, KREIDER B. Quantification of the effects of the astrocytes on oligodendroglial morphology. *J Neurosci Res* 1997; **49**: 219–228.
- [33] NAKAYAMA H, KIATIPATTANASAKUL W, NAKAMURA S, MIYAWAKI K, KIKUTA F, UCHIDA K, KUROKI K, MAKIFUCHI T, YOSHIKAWA Y, DOI K. Fractal analysis of senile plaque observed in various animal species. *Neurosci Lett* 2001; **297**: 195–198.
- [34] NIELSEN B, ALBREGTSEN F, DANIELSEN HE. The use of fractal features from the periphery of cell nuclei as a classification tool. *Analit Cellular Pathol* 1999; **19**: 21–37.

- [35] ORŁOWSKI D, ZIAJA M, SOŁTYS Z, JANECKO K. Zmiany morfologii mikrogleju w rozwijającym się mózgu szczura. V Konferencja Neurochemiczna: Molekularne podstawy patologii i terapii schorzeń neurologicznych. Warszawa 14.12.2000.
- [36] RIGAUT JP, SCHOEVAERT-BROSSAULT D, DOWNS AM, LANDINI G. Asymptotic fractals in the context of grey-scale images. *J Microsc* 1998; 189: 57–63.
- [37] RYBACZUK M, ZIELIŃSKI W. The concept of physical and fractal dimension I. The projective dimensions. *Chaos Solit Fract* 2001; 12: 2517–2535.
- [38] RYBACZUK M, KĘDZIA A, ZIELIŃSKI W. The concept of physical and fractal dimension II. The differential calculus in dimensional spaces. *Chaos Solit Fract* 2001; 12: 2537–2552.
- [39] SANDAU K, KURZ H. Measuring fractal dimension and complexity – an alternative approach with an application. *J Microsc* 1997; 186: 164–176.
- [40] SCHAFFNER AE, GHESQUIERE A. The effect of type I astrocytes on neuronal complexity: a fractal analysis. *Methods* 2001; 24: 323–329.
- [41] SMITH JR. TG, LANGE GD, MARKS WB. Fractal methods and results in cellular morphology-dimensions, lacunarity and multifractals. *J Neurosci Methods* 1996; 69: 123–136.
- [42] SMITH JR. TG, MARKS WB, LANGE GD, SHERIFF JR. WH, NEALE EA. A fractal analysis of cell images. *J Neurosci Methods* 1989; 27: 173–180.
- [43] SOŁTYS Z, JANECKO K, ORZYŁOWSKA-ŚLIWIŃSKA O, ODERFELD-NOWAK B, ZAREMBA M, JANUSZEWSKI S, MOSSAKOWSKI MJ. Ilościowa morfologia komórek glejowych o wzmożonej ekspresji receptorów NGF w polu CA1 hipokampa szczura po niedokrwieniu mózgu. V Konferencja Neurochemiczna: Molekularne podstawy patologii i terapii schorzeń neurologicznych. Warszawa 14.12.2000.
- [44] SOŁTYS Z, ZIAJA M, PAWLIŃSKI R, SETKOWICZ Z, JANECKO K. Morphology of reactive microglia in the injured cerebral cortex. Fractal analysis and complementary quantitative methods. *J Neurosci Res* 2001; 63: 90–97.
- [45] TAKEDA T, SAKATA A, MATSUOKA T. Fractal dimension in the occurrence of miniature end-plate potential in a vertebrate neuromuscular junction. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat* 1999; 23: 1157–1169.
- [46] TANG S, MA Y, SEBASTINE IM. The fractal nature of *Escherichia coli* biological flocs. *Colloids Surf B: Biointerf* 2001; 20: 211–218.
- [47] TOURASSI GD, FREDERICK ED, VITTITOE NF, COLEMAN RE. Fractal texture analysis of perfusion lung scans. *Comput Biomed Res* 2000; 33: 161–171.
- [48] VILELA MJ, MARTINS ML, BOSCHETTI SR. Fractal patterns for cells in culture. *J Pathol* 1995; 177: 103–107.
- [49] WALISZEWSKI P, MOLSKI M, KONARSKI J. On the holistic approach in cellular and cancer biology: nonlinearity, complexity, and quasi-determinism of the dynamic cellular network. *J Surgical Oncol* 1998; 68: 70–78.
- [50] WALISZEWSKI P, MOLSKI M, KONARSKI J. Self-similarity, collectivity, and evolution of fractal dynamics during retinoid-induced differentiation of cancer cell population. *Fractals* 1999; 7: 139–149.
- [51] WALISZEWSKI P, KONARSKI J, MOLSKI M. On the modification of fractal self-space during cell differentiation or tumour progression. *Fractals* 2000; 8: 195–203.
- [52] WALISZEWSKI P, MOLSKI M, KONARSKI J. On the relationship between fractal geometry of space and time in which a system interacting cells exists and dynamics of gene expression. *Acta Biochim Pol* 2001; 48: 209–220.
- [53] WEST GB, BROWN JH, ENQUIST BJ. The fourth dimension of life: fractal geometry and allometric scaling of organisms. *Science* 1999; 284: 1677–1679.
- [54] WINGATE RJT, FITZGIBBON T, THOMPSON ID. Lucifer yellow, retrograde tracers, and fractal analysis characterise adult ferret retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* 1992; 323: 449–474.
- [55] YANG X, BEYENAL H, HARKIN G, LEWANDOWSKI Z. Evaluation of biofilm image thresholding methods. *Wat Res* 2001; 35: 1149–1158.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 11.12.2001 r.

Przyjęto: 08.03.2002 r.

Adres autorów: Ul. Ingardena 6, 30-060 Kraków

e-mail: orlowski@uj.edu.pl